

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Ondřej Mráček

VYUŽITÍ PRACOVNÍ STŘÍBRNÉ PEVNÉ ELEKTRODY PŘI
VOLTAMETRICKÉM STANOVENÍ LÉČIVA
METRONIDAZOL

Utilization of Working Silver Solid Electrode for Voltammetric
Determination of Drug Metronidazole

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 5. května 2020.

Ondřej Mráček

Poděkování

Úplně na začátku bych rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a ochotu, se kterou mě během mé práce provázel. Dále bych chtěl rovněž poděkovat kolektivu v laboratoři č. 113 za veškerou vstřícnost z jejich strany.

Moje poděkování patří také mým kamarádům, kteří pro mě byli velkou psychickou podporou nejen při této práci, ale i během celého uplynulého studia.

Nakonec bych rád poděkoval mé rodině, která mi umožnila na vysoké škole studovat.

Tato bakalářská práce byla vypracována v rámci Specifického vysokoškolského výzkumu (projekt SVV260560) a finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt GAČR 20-01589S).

Klíčová slova

metronidazol

antibiotika

analýza léčiv

elektrochemie

diferenční pulzní voltametrie (DPV)

stříbrná elektroda

Key words

Metronidazole

Antibiotics

Drug Analysis

Electrochemistry

Differential Pulse Voltammetry (DPV)

Silver Electrode

Abstrakt

Předmětem předkládané bakalářské práce bylo studium elektrochemického chování léčiva metronidazol a nalezení optimálních podmínek pro jeho voltametrické stanovení na pracovní stříbrné pevné elektrodě (AgSE) pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV).

Voltametrické chování vybraného léčiva bylo prostudováno v závislosti na pH ve vodném prostředí Brittonova-Robinsonova pufru (BRP). Jako nejlépe vyhovující prostředí pro voltametrické stanovení studovaného léčiva metronidazol na AgSE v katodické oblasti potenciálů bylo zvoleno prostředí Brittonova-Robinsonova pufru se zásaditou složkou hydroxidu sodného (Na-BRP) o pH 10,0, ve kterém byly dále proměřeny, ve voltametrické cele o objemu 10 ml, koncentrační závislosti v rozmezí $(1-1000) \cdot 10^{-6}$ mol/l. Dosažené meze stanovitelnosti (*LOQ*) a meze detekce (*LOD*) metronidazolu byly pro DPV na AgSE $1,8 \cdot 10^{-6}$ mol/l a $5,5 \cdot 10^{-7}$ mol/l.

Dále byl pro látku metronidazol sledován vliv elektrochemické regenerace na AgSE. Jako optimální elektrochemické regenerační potenciály byly zvoleny potenciály s těmito parametry: $N_r = 150$, $E_{in_r} = 0$ mV, $T_{in_r} = 0,1$ s, $E_{fin_r} = -1500$ mV, $T_{fin_r} = 0,1$ s.

V další části měření byla studována elektrochemická aktivita AgSE, která není zcela ideální.

Aplikovatelnost nově vyvinuté metody pro stanovení léčiva metronidazol bude možno v budoucnu ověřit pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV) na modelových vzorcích pitné vody a vybraných lékových formách.

Abstract

This Bachelor thesis discusses the electrochemical behavior of metronidazole and seeks to find optimal conditions for the drug's voltammetric determination at a working silver solid electrode (AgSE) using differential pulse voltammetry (DPV).

The voltammetric behavior of the drug was investigated, where the dependent variable was the pH of a water medium Britton-Robinson buffer (BRB). The optimum medium for voltammetric determination of metronidazole at a AgSE is a region of cathodic potential chosen to be the Britton-Robinson buffer, where the sodium hydroxide alkaline component (Na-BRB) has a pH of 10.0, and then measured further at voltammetric cell (volume of 10 ml) at concentration dependencies in the range of $(1-1000) \times 10^{-6}$ mol/l. The limit of quantification (*LOQ*) and the limit of detection (*LOD*) were found to be 1.8×10^{-6} mol/l and 5.5×10^{-7} mol/l, respectively.

In addition, the metronidazole was studied for the effect of electrochemical regeneration at the AgSE, where the parameters were: $N_r = 150$, $E_{in_r} = 0$ mV, $T_{in_r} = 0.1$ s, $E_{fin_r} = -1500$ mV, $T_{fin_r} = 0.1$ s.

The next section studies the electrochemical activity of the AgSE, which is not entirely ideal.

The newly developed method might be applicable in the future for determining metronidazole through differential pulse voltammetry (DPV) to model samples of drinking water and selected pharmaceutical formulation.

Seznam použitých zkratk

AgSE	pracovní stříbrná pevná elektroda (working silver solid electrode)
BRP	Brittonův-Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [mol/l] nebo [μ mol/l]
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E	elektrodotový potenciál na AgSE [mV]
E_b	elektrodotový potenciál pufru shodný s proudem píku metronidazolu [mV]
E_{fin}	konečný elektrodotový potenciál měření na AgSE [mV]
E_{in}	počáteční elektrodotový potenciál měření na AgSE [mV]
E_p	elektrodotový potenciál shodný s proudem píku metronidazolu [mV]
E_{fin_r}	konečný regenerační potenciál [mV]
E_{in_r}	počáteční regenerační potenciál [mV]
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
I	proud na AgSE [nA]
I_b	proud pufru v oblasti píku metronidazolu [nA]
I_p	proud píku metronidazolu [nA]
k	směrnice přímky [$nA \cdot l / \mu mol$]
Li-BRP	Brittonův-Robinsonův pufr se zásaditou složkou hydroxidu lithného
LOD	limit detekce (limit of detection) [mol/l]
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantification) [mol/l]
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
n	počet měření ve voltametrické cele o objemu 10,0 ml
Na-BRP	Brittonův-Robinsonův pufr se zásaditou složkou hydroxidu sodného
N_r	počet cyklů elektrochemické regenerace před každým měřením
p-AgSA-CE	leštěná stříbrná pevná amalgámová kompozitní elektroda
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
q	úsek přímky [nA]
R^2	koeficient determinace
s	směrodatná odchylka [nA]
T_{fin_r}	doba trvání konečného regeneračního potenciálového pulsu
T_{in_r}	doba trvání počátečního regeneračního potenciálového pulsu
v_p	rychlost polarizace na AgSE [mV/s]

Obsah

1 Úvod	9
1.1 Cíl práce	9
2 Teoretická část	10
2.1 Nitroimidazolové deriváty	10
2.2 Metronidazol	12
2.2.1 Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti	12
2.2.2 Mechanismus účinku	13
2.2.2.1 Absorpce	14
2.2.2.2 Distribuce	14
2.2.2.3 Biotransformace	14
2.2.2.4 Eliminace	15
2.3 Metody stanovení a detekce léčiva metronidazol	15
2.3.1 Elektrochemické metody	15
2.3.2 Separační metody	15
2.3.3 Spektrální metody	16
2.3.4 Stanovení metronidazolu lékopisnou metodou	16
3 Experimentální část	17
3.1 Reagencie	17
3.2 Instrumentace	18
3.3 Výpočet meze stanovitelnosti a detekce	19
4 Výsledky a diskuse	20
4.1 Voltametrické chování metronidazolu	20
4.2 Správné vyhodnocení výšky píku metronidazolu	23
4.3 Vyhodnocení škály pH pro metronidazol v Na-BRP	24
4.4 Vliv elektrochemické aktivace, regenerace a leštění na AgSE	27
4.5 Testování dalších pufrů	28
4.6 Vliv pH na potenciál píku metronidazolu	29
4.7 Kalibrační závislosti	30
5 Závěr	33
6 Použitá literatura	34

1 Úvod

1.1 Cíl práce

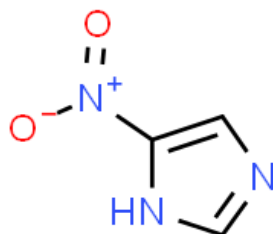
Cílem této práce je vývoj voltametrické metody pro stanovení léčiva metronidazol v pufovaném vodném prostředí pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV) na pracovní stříbrné pevné elektrodě (AgSE) se záměrem dosáhnout co nejnižší meze stanovitelnosti (*LOQ*) a detekce (*LOD*) při zvoleném tlumícím roztoku a zároveň nejvhodnějším pH tohoto pufru.

Dalším cílem byla i redukce šumu základního elektrolytu prostřednictvím aktivace, elektrochemické regenerace a leštění pracovní stříbrné pevné elektrody (AgSE).

Posledním cílem bylo proměření kalibrační závislosti metronidazolu a to v největším možném koncentračním rozsahu.

2 Teoretická část

2.1 Nitroimidazolové deriváty

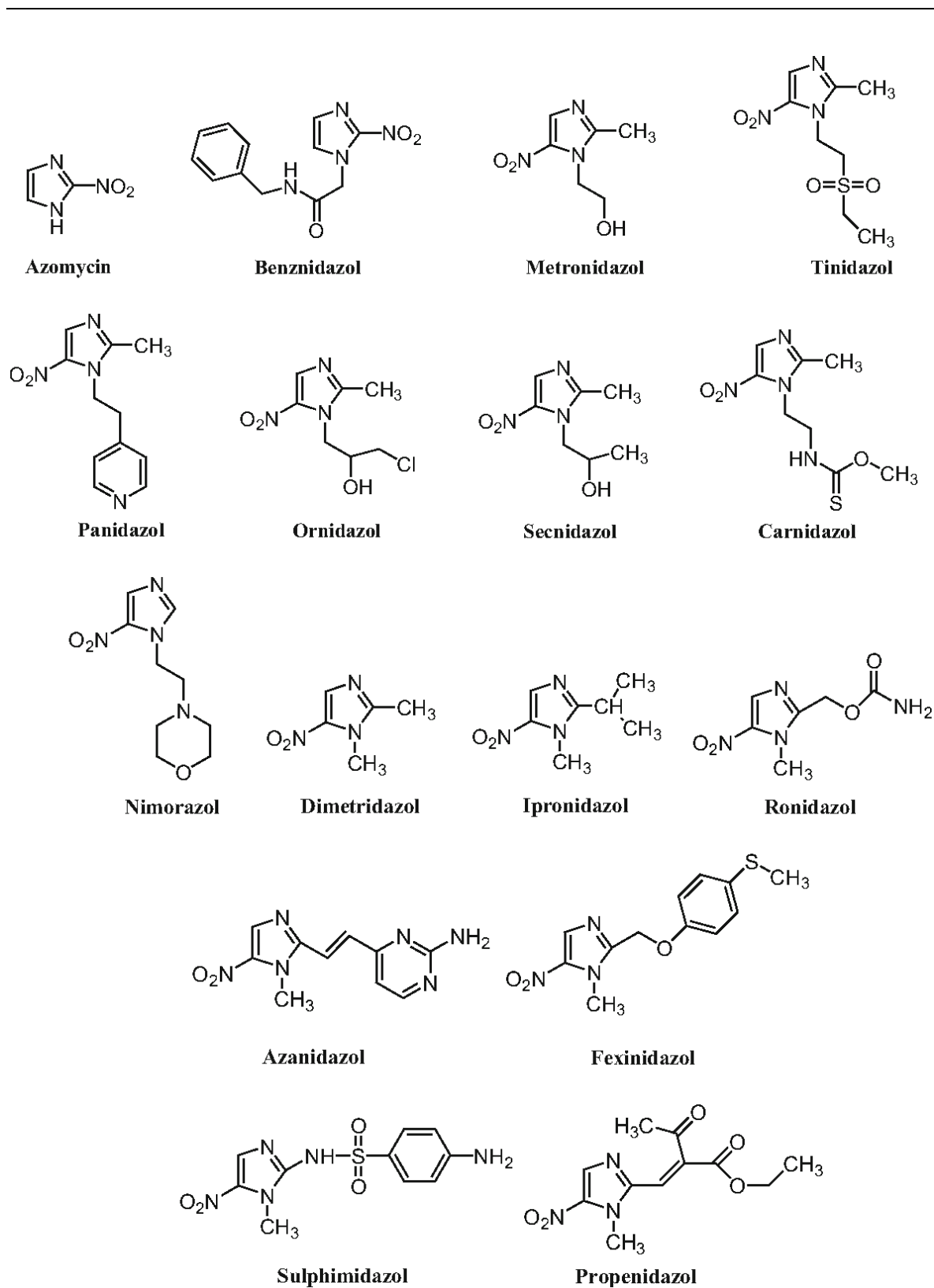


Obrázek 1 - Strukturní vzorec 5-nitroimidazolu [1]

Jako první sloučeninou obsahující imidazolový kruh byla v roce 1953 izolována a následně roku 1965 syntetizována antimikrobiální nitrosloučenina azomycin (**obrázek 1**), ačkoliv nitrace této molekuly byla známa již od roku 1892 [2].

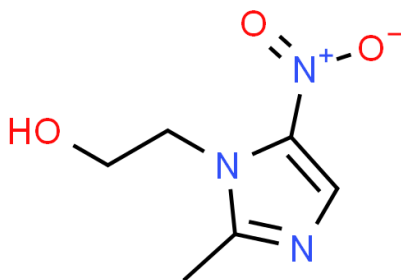
Struktura nitroimidazolových léčiv je ve své podstatě velice podobná, čemuž odpovídají i jejich společné biologické vlastnosti, a to například účinnost těchto derivátů proti anaerobním bakteriím a parazitickým prvokům u lidí a zvířat. Pro žádoucí terapeutický účinek je nezbytná 5-nitroskupina v poloze 5, která má antimikrobiální, ale také mutagenní efekt. Při redukci této 5-nitroskupiny dochází ke vzniku krátkodobého intermediátu hydroxylaminu, který se dokáže kovalentně vázat na různé tkáňové makromolekulární struktury, například na DNA. Po navázání na deoxyribonukleovou kyselinu dochází ke ztrátě spirálovitého uspořádání, což má za následek zabránění syntézy nukleových kyselin a posléze buněčné smrti [3]. Bylo zjištěno, že nitroimidazoly vyvolávají mutace v bakteriálních testovacích systémech a na laboratorních zvířatech, u kterých následně dochází ke zvýšení množství tkání zasažených nádorovým bujením [2]. Při metabolické redukci těchto látek lze pozorovat negativnější (nižší) redukční potenciál u anaerobních organismů než u aerobních, a proto další vlastností nitroimidazolových léčiv je schopnost působit efektivně na organismy, které žijí pouze v prostředí bez kyslíku [4].

Konkrétní případy léčiv obsahující imidazolový kruh spolu s nitroskupinou v poloze 5 jsou zejména metronidazol, dimetridazol, tinidazol a ornidazol (přehled nitroimidazolových antibiotik je uveden na **obrázku 2**), což jsou látky vhodné pro terapii velkého spektra nemocí, včetně nitrobršních, plicních a mozkových abscesů, chronických sinusitid a otitid, a léčbu infekcí pohlavních cest [5].



Obrázek 2 - Přehled nitroimidazolových antibiotik [6]

2.2 Metronidazol



Obrázek 3 - Strukturní vzorec metronidazolu [7]

2.2.1 Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti

Metronidazol, 2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol (**obrázek 3**), o molekulové hmotnosti 171,16 g/mol je bílý nebo nažloutlý krystalický prášek, který je obtížně rozpustný v acetonu, v 96% ethanolu, dichlormethanu a velmi těžce rozpustný v etheru [8]. Jeho rozpustnost při 25 °C ve vodě je 11,00 g/l [9].

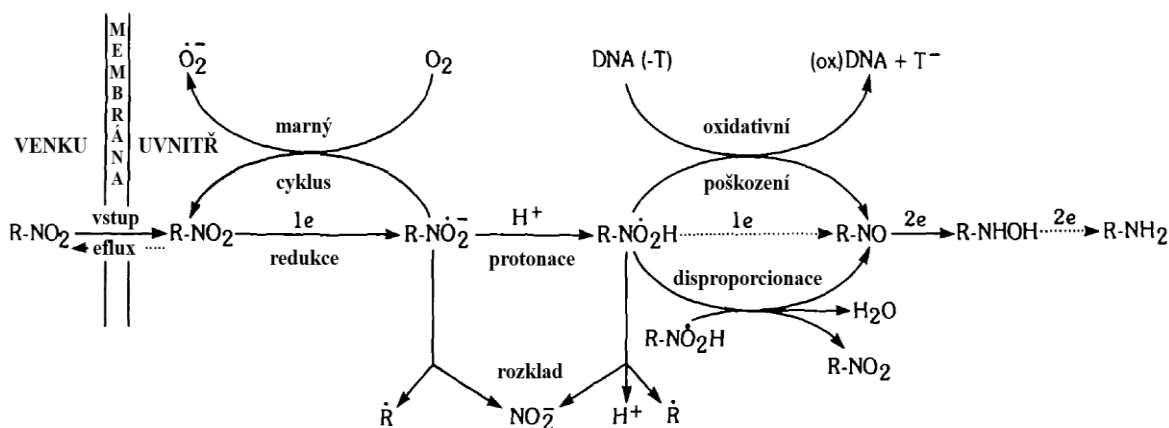
Většina gram-negativních a gram-pozitivních anaerobních bakterií reaguje pozitivně na léčebný účinek tohoto antibiotika. Dále metronidazol dobře působí proti prvokům, jako je *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* a *Trichomonas vaginalis*. Zajímavostí je, že první účinná léčba pomocí tohoto nitroimidazolového léčiva byla schválena již před 50 lety u právě posledně zmíněného prvoka *Trichomonas vaginalis*. Velice citlivé bývají především gram-negativní anaerobní bakterie (*Bacteroides* a *Fusobacterium spp.*). U gram-pozitivních bakterií (*Peptostreptococci* a *Clostridia spp.*) dochází častěji k výskytu rezistence vůči tomuto antibiotiku. Jako příklad gram-variabilní bakterie rodu *Bacillus* způsobující onemocnění léčitelné pomocí metronidazolu je *Gardnerella vaginalis*.

Díky nízkým pořizovacím nákladům a zároveň přijatelnému profilu nežádoucích účinků z hlediska farmakokinetiky a farmakodynamiky je metronidazol dále řazen mezi velice účinná léčiva. V poslední době je sice nahrazován jinými kombinacemi medikamentů proti smíšeným aerobním a anaerobním infekcím, ale i přesto je stále hojně využíván velkým množstvím lékařů, kteří považují metronidazol za takzvaný “zlatý standard“ [10].

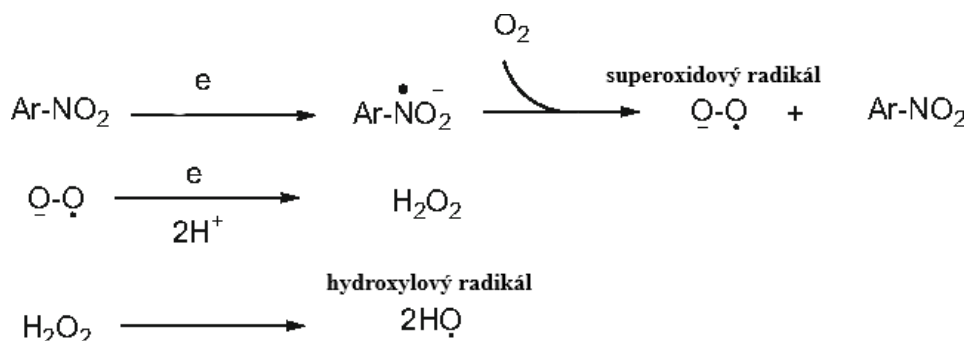
Antiprotozoální a zároveň antibakteriální léčivo metronidazol je mimo jiné komerčně dostupné pod obchodním označením Metro nebo Flagyl [11].

2.2.2 Mechanismus účinku

Na základě různých výzkumů o mechanismu působení metronidazolu (obecný mechanismus účinku nitroimidazolů je uveden na **obrázku 4.**) se předpokládají čtyři klíčové fáze jeho účinku: (1) vstup do bakteriální buňky, (2) redukce nitroskupiny, (3) cytotoxický účinek redukováného produktu, (4) uvolnění konečných produktů, které už nemají žádnou větší aktivitu. Klíčový moment pro usmrcení mikroorganismů je cytotoxický účinek metabolitů metronidazolu v druhé fázi, kdy dochází k vytvoření toxických intermediátů (mimo jiné i ke vzniku volných radikálů viz **obrázek 5**), které mohou reagovat s RNA, DNA nebo případně s buněčnými proteiny [10]. Konkrétně jde u anaerobních mikroorganismů o katalýzu enzymů pyruvát-ferredoxin oxidoreduktasu a pak případně nitroreduktasu [12].



Obrázek 4 - Mechanismus účinku nitroimidazolů [4]



Obrázek 5 - Vznik volných radikálů [13]

2.2.2.1 Absorpce

Absorpce metronidazolu byla testována například pomocí tablet (orální aplikace), čípků (vaginální a rektální aplikace) o celkovém množství podaného léčiva 500 mg. Pro lokální aplikaci na obličej byl nanesen 1 g gelu [10,14].

Při orálním podání tablet byla hlášena výborná biologická dostupnost ($\geq 90\%$). Pokud byl aplikován intravaginální čípek, pak jeho účinnost odpovídala 25 % dávky podané orálně [15]. Jako účinnější se zde jeví aplikace 0,75 % vaginálního gelu o dávce 5 g, u kterého je biologická dostupnost 56 % ve srovnání s intravenózním podáním 500 mg metronidazolu [16,17]. Po rektální aplikaci čípku, který obsahoval 500 mg metronidazolu, byla v testovaném organismu zjištěna 67-87% biologická dostupnost. Absorpce 0,75 % gelu o hmotnosti 1 g při aplikaci na obličej dospělého člověka byla údajně docela nízká, jelikož v následujících 24 hodinách už byly změřené sérové koncentrace metronidazolu na hranici detekce [10,14].

2.2.2.2 Distribuce

Distribuce a penetrace do buněk byla zjištěna jako velice dobrá, ale co se týče vazby na proteiny, jde o hodnotu menší než 20 %. Koncentrace metronidazolu v extracelulární tekutině ekvivalentně odpovídá hodnotě nalezené po vniknutí do granulocytů. Předpokládá se, že metronidazol dobře proniká do cerebrospinální tekutiny, a i do centrální nervové soustavy (CNS) [10,14].

2.2.2.3 Biotransformace

Metronidazol se v játrech přeměňuje na pět dalších sloučenin, z čehož dvě hlavní jsou kyselý metabolit (2-methyl-5-nitroimidazolyloctová kyselina [18]), ale významný je především hydroxymetabolit (1-(2-hydroxyethyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazol [14]), který je hydroxylací na hydroxymetronidazol tvořen z původních sloučenin až z 80 % [19]. Kyselý metabolit má biologickou aktivitu pouze 5 % mateřské sloučeniny (nelze jej detekovat u pacientů se zdravými ledvinami) [14], zatímco hydroxymetabolit je klinicky mnohem důležitější [20], protože jeho antimikrobiální aktivita odpovídá 30-65 % původního metronidazolu [10].

2.2.2.4 Eliminace

K vylučování metronidazolu močí, dochází v nezměněné formě pouze z 6-18 %. Primárně je však vylučován do žluči, a do moči je pak eliminován ve formě svých metabolitů. Z původní dávky metronidazolu je přibližně 24-28 % přeměněno na metabolit hydroxymetronidazol, který je následně vyloučen především močí. Poločas eliminace metronidazolu u lidí, kteří mají zdravá játra a ledviny, se po podání pohybuje v rozmezí od 6 až do 10 hodin [10,14].

2.3 Metody stanovení a detekce léčiva metronidazol

Při stanovení léčiva metronidazol je možné využít mnoho různých chemických postupů, a proto byla dále věnována pozornost především obecnému popisu použitých metod. V poslední části této kapitoly byla kladena pozornost stanovení metronidazolu dle lékopisu.

2.3.1 Elektrochemické metody

Výhodou elektroanalytických technik jsou především přijatelné náklady na stanovení, instrumentální jednoduchost provedení a dále výhoda, že oxidačně-redukční mechanismy léčiv probíhající na elektrodách jsou ve své podstatě velice podobné těm v lidském těle [21]. Metronidazol lze stanovit voltametriky například pomocí modifikované uhlíkové pastové elektrody [22], leštěné stříbrné pevné amalgámové kompozitní elektrody [23], rtuťovým meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrody [24,25] anebo borem dopované diamantové filmové elektrody [25].

2.3.2 Separační metody

Co se týče separačních metod, používají se ve velké míře hlavně z důvodu své citlivosti, selektivity a rychlosti analýzy. Problémem takovéto instrumentace mohou být ale vysoké pořizovací a provozní náklady [24]. Pomocí HPLC lze analyzovat metronidazol souběžně s mikonazolem v přípravku Klion D-100 (vaginální tablety) s UV detektorem [26] nebo současně s nitroimidazoly a chinolony v medu pomocí LC s detekcí MS/MS [27]. Je rovněž možné stanovení metronidazolu v lidské plasmě pomocí HPLC s UV detektorem [28] anebo simultánní stanovení amoxicillinu, metronidazolu a ciprofloxacinu prostřednictvím ekologicky vhodné metody LC spolu s UV detekcí v aplikaci pro lékové formy a lidskou moč [29].

2.3.3 Spektrální metody

Jako nejběžnější detektory v separačních metodách jsou využívány především detektory spektrometrické [30]. Lze tedy pomocí VIS spekter stanovit například společně secnidazol a metronidazol ve farmaceutických preparátech [31] nebo norfloxacin a metronidazol v kombinované dávce tablet [32], a v poslední řadě lze použitím vanilinu a *p*-dimethylaminobenzaldehydu (PDAB) jako kondenzačního činidla tvořícího žluté Schiffovy báze stanovit metronidazol ve farmaceutických preparátech [33].

2.3.4 Stanovení metronidazolu lékopisnou metodou

Kvalitativní detekce se provádí zaprvé pomocí teploty tání metronidazolu, jemuž odpovídá přibližně hodnota 159-163 °C. V dalším kroku je k 10 ml původního vzorku přidáno 10 g práškového zinku, dále 1 ml vody a 0,25 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové. Tato směs se nechá 5 minut zahřívat ve vodní lázni a následně se roztok ochladí. Po této poslední úpravě, je vzniklý roztok připraven k pokusu, ve kterém lze dokázat prvotně obsažené léčivo metronidazol pomocí zkoušky na aromatické aminy.

Kvantitativní stanovení se provádí tak, že se 0,1500 g vzorku metronidazolu rozpustí v 50 ml ledové (bezvodé) kyseliny octové a pak se tato směs titruje kyselinou chloristou ($c = 0,1 \text{ mol/l}$). Bod ekvivalence se detekuje pomocí potenciometrické indikace, kdy v měřicím systému dochází ke změnám rozdílu potenciálů mezi dvěma použitými elektrodami. Jako indikační elektroda může být použita vhodná kovová elektroda (např. platinová, zlatá, rtuťová). Srovnávací elektrodou může být buď kalomelová, nebo argentchloridová elektroda. Při měření je důležité v použitém systému dodržet prakticky nulový protékající proud a dále by zařízení mělo obsahovat voltmetr s přesností odečtu přinejmenším na 1 mV. Pro výpočet obsahu metronidazolu v titrovaném vzorku odpovídá 1 ml kyseliny chloristé ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) 17,2 mg této stanovované sloučeniny [8].

3 Experimentální část

3.1 Reagencie

Zkoumanou látkou byl metronidazol v p.a. čistotě od firmy Sigma-Aldrich. Na začátku byl pro optimalizaci pH a regeneračních potenciálů připraven zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l navážením 0,0171 g metronidazolu a kvantitativním převedením redestilovanou vodou do 100ml odměrné baňky. Dále byl přichystán koncentrovanější roztok metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l, navážením 0,0427 g a kvantitativním převedením redestilovanou vodou do 25ml odměrné baňky. Tento zásobní roztok byl použit při měření kalibračních závislostí, a to pro všechny uvedené koncentrační řády $(1-10) \cdot 10^{-6}$, $(1-10) \cdot 10^{-5}$ a $(1-10) \cdot 10^{-4}$ mol/l. Zásobní roztoky metronidazolu byly uchovávány za nepřístupu světla.

Kyselá složka BRP byla připravena smícháním 2,7 ml 85% kyseliny trihydrogenfosforečné (p.a., Lach-Ner, Neratovice), 2,3 ml 99% kyseliny octové (p.a., Ing. Petr Švec, Penta, Praha), rozpuštěním 2,47 g kyseliny trihydrogenborité (p.a., Ing. Petr Švec, Penta, Praha) a doplněním redestilovanou vodou na objem 1 litr. Připravený roztok o koncentraci 0,04 mol/l byl uchováván ve tmě v průhledné skleněné zásobní láhvi.

Zásaditá složka BRP byla připravena rozpuštěním 8,09 g pevného hydroxidu sodného (p.a., Ing. Petr Švec, Penta, Praha) v 1 litru redestilované vody. Vzniklý roztok o koncentraci 0,2 mol/l byl taktéž uchováván ve tmě v průhledné skleněné zásobní láhvi.

Druhá zásaditá složka pro BRP byla připravena rozpuštěním 2,39 g hydroxidu lithného (pro speciální účely, druh A, Chemapol, Praha) v 0,5 litru redestilované vody. Vzniklý zásobní roztok o koncentraci 0,2 mol/l byl uchováván ve tmě ve skleněné láhvi.

Sodný BRP (Na-BRP) o příslušném pH byl připraven smícháním jeho zásadité (NaOH) a kyselé složky.

Lithný BRP (Li-BRP) byl připraven smícháním jeho zásadité (LiOH) a kyselé složky na pH 10,0.

Použitá redestilovaná (deionizovaná) voda byla připravena přístrojem (Millipore Milli-Q Plus System, Millipore USA).

3.2 Instrumentace

Měření bylo provedeno na přístroji Mini- and Microelectrode System UM μ E, v tříelektrodovém zapojení s nastavenou citlivostí I, který byl propojen s počítačem. (V programu je v tomto případě nutné zaškrtnout zvětšení citlivosti 100 \times , jinak by přístroj neměřil správně. Pro maximální offset byl použit rozsah 100 μ A.) V tomto uspořádání byly použity jako pracovní (working) stříbrná pevná elektroda (AgSE, typ: 6.1204.130, Metrohm, Švýcarsko), argentchloridová referentní (reference) elektroda a pomocná (auxiliary) platinová elektroda. Pro záznam měření byl použit program Polar 5.1 Pro (Polaro Sensors, Praha), který pracoval pod operačním systémem Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Jako detekční technika byla použita diferenční pulzní voltametrie (DPV) s následujícími parametry: rychlost polarizace (v_p) 20 mV/s, výška pulzu -50 mV, šířka pulzu (se vzorkováním proudu po dobu posledních 20 ms), doba trvání pulzu 150 ms.

Ve voltametrické cele byly proměřovány vzorky o celkovém objemu 10,0 ml. Při studiu voltametrického stanovení metronidazolu při různém pH a při optimalizaci regeneračních potenciálů byly použity vzorky metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l, které byly připraveny pipetováním 1 ml zásobního roztoku o hodnotě $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l a doplněním objemu na 10,0 ml. Pro analyzování samotného pufru bylo do cely nalito pokaždé také 10 ml tohoto pufru. Měření kalibrační závislosti bylo provedeno pomocí přídavek metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ a $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Z důvodu odstranění rozpuštěného kyslíku ve všech analyzovaných roztocích bylo vždy před samotným měřením přistoupeno ke dvouminutovému probublávání roztoku v cele plynným dusíkem. Po každém měření nalitého vzorku do cely o objemu 10 ml, byla elektroda opláchnuta redestilovanou vodou a opatrně otřena buničinou do sucha.

Přesná hodnota pH vodných roztoků byla naměřena pomocí digitálního pH-metru Jenway 3510 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou elektrodou (typ: 924 005). Přístroj byl nakalibrován pomocí standardních kalibračních pufrů o určitém pH (4,00; 7,00 a 9,00).

3.3 Výpočet meze stanovitelnosti a detekce

Mez stanovitelnosti (LOQ) byla vypočtena podle následujícího vztahu:

$$LOQ = \frac{10 \cdot s}{k}$$

kde s je směrodatná odchylka pěti stanovení analytu o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu kalibrační přímky a k je směrnice příslušné kalibrační přímky.

Mez detekce (LOD) byla vypočtena podle následujícího vztahu:

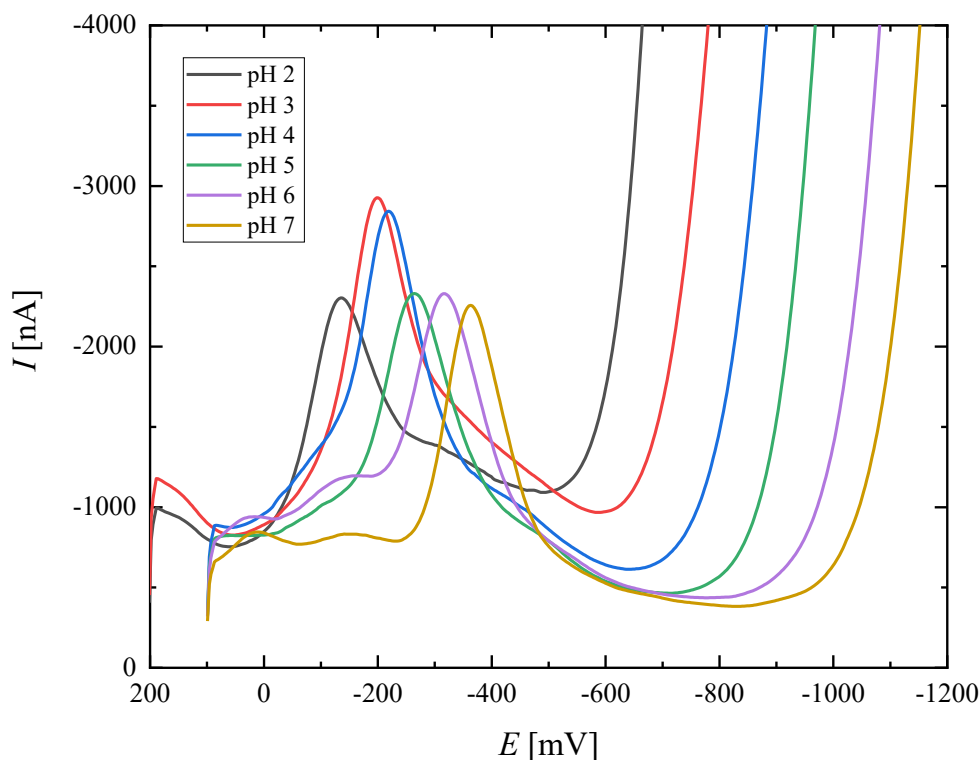
$$LOD = \frac{3 \cdot s}{k}$$

kde s je opět směrodatná odchylka pěti stanovení analytu o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu kalibrační přímky a k je směrnice příslušné kalibrační přímky.

4 Výsledky a diskuse

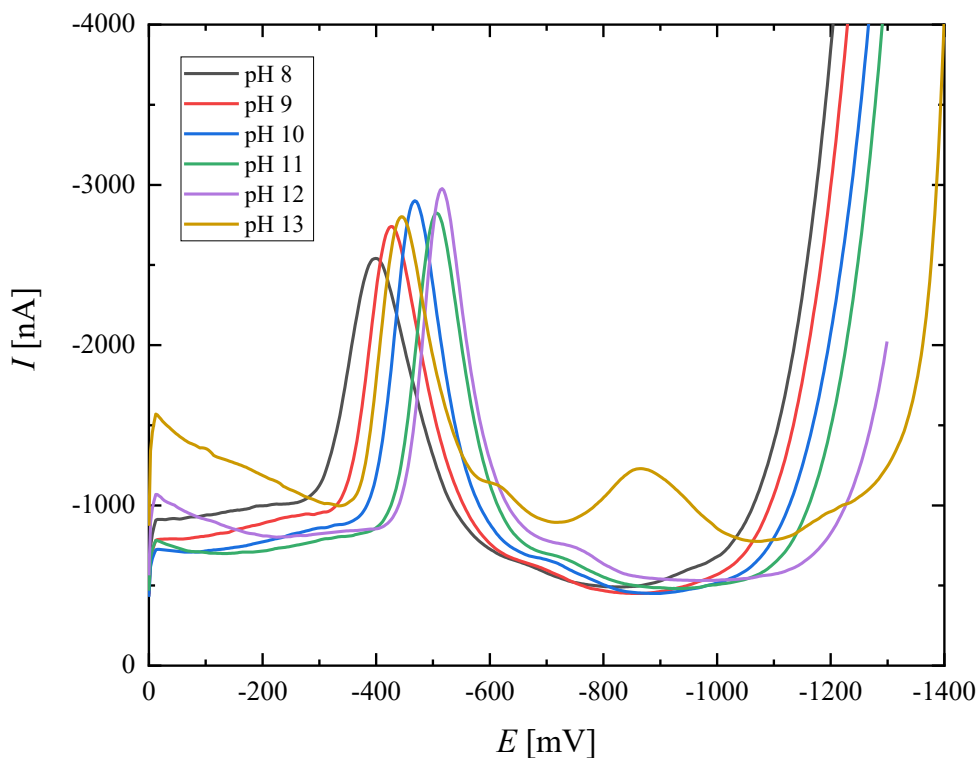
4.1 Voltametrické chování metronidazolu

Prvním krokem při optimalizaci voltametrické metody pro stanovení metronidazolu bylo nalezení vhodného prostředí (základního elektrolytu). Z tohoto důvodu byly měřeny voltamogramy metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l při hodnotách pH: 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; 12,0 a 13,0. Před tímto měřením byla nejdříve provedena aktivace elektrody (za stálého míchání roztoku byl na AgSE vložen potenciál -2200 mV po dobu 5 minut) v kyselé složce pufru při pH 1,88. Výsledky měření byly rozděleny do dvou grafů: **obrázek 6** pro pH 2,0-7,0 a **obrázek 7** pro pH 8,0-13,0. Pro zajímavost byly v grafech ponechány úniky proudu při počínajícím rozkladu základního elektrolytu. Hodnoty použitých počátečních a konečných potenciálů jsou uvedeny v **tabulce 1**. Potenciály a proudy vrcholu píku při určitém pH jsou vyznačeny v **tabulce 2**.



Obrázek 6 - DP voltamogramy metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l zaznamenané na AgSE v Na-BRP v rozmezí pH 2,0-7,0 (bez regenerace AgSE, $v_p = 20$ mV/s, stupeň vyhlazení křivek 7 metodou Adjacent-Averaging s váženým průměrem).

Všechny dané křivky v **obrázku 7** byly měřeny od potenciálu 0 mV. Při pH 12,0 bylo potenciálové okno od 0 mV pouze do -1300 mV. Pro tuto křivku je předpokládán stejný narůstající průběh úniku proudu při počínajícím rozkladu základního elektrolytu jako u ostatních měření.



Obrázek 7 - DP voltamogramy metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l zaznamenané na AgSE v Na-BRP v rozmezí pH 8,0-13,0 (bez regenerace AgSE, $v_p = 20$ mV/s, stupeň vyhlazení křivek 7 metodou Adjacent-Averaging s váženým průměrem).

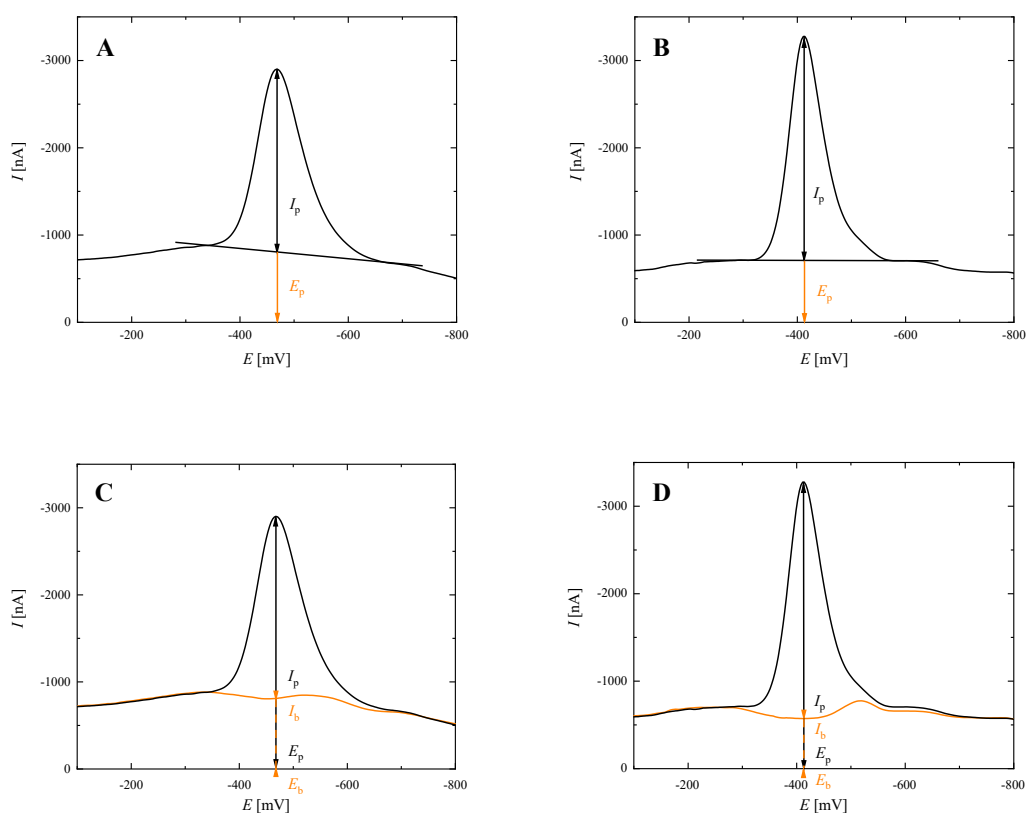
Z **obrázků 6 a 7** je patrné, že metronidazol v celém studovaném rozmezí pH poskytuje jeden dobře vyvinutý voltametrický pík (odpovídající klasické čtyřelektronové redukci přítomné nitroskupiny na odpovídající hydroxylamin) a že nejvhodnější podmínky pro další měření jsou při pH 10,0. DPV pík metronidazolu je dostatečně vysoký, typicky Gaussovský a zároveň má při tomto pH relativně nízkou proudovou odezvu pozadí. Za povšimnutí stojí pH 13,0, které už pro danou elektrodu zřejmě není úplně vhodné, což potvrzují dále **obrázky 9 a 10**.

Tabulka 1 - Počáteční (E_{in}) a konečné (E_{fin}) potenciály měření v rozmezí pH 2,0-13,0.

pH	E_{in} [mV]	E_{fin} [mV]
2,0	200	-800
3,0	200	-800
4,0	100	-1000
5,0	100	-1000
6,0	100	-1200
7,0	100	-1200
8,0	0	-1300
9,0	0	-1300
10,0	0	-1300
11,0	0	-1300
12,0	0	-1300
13,0	0	-1500

4.2 Správné vyhodnocení výšky píku metronidazolu

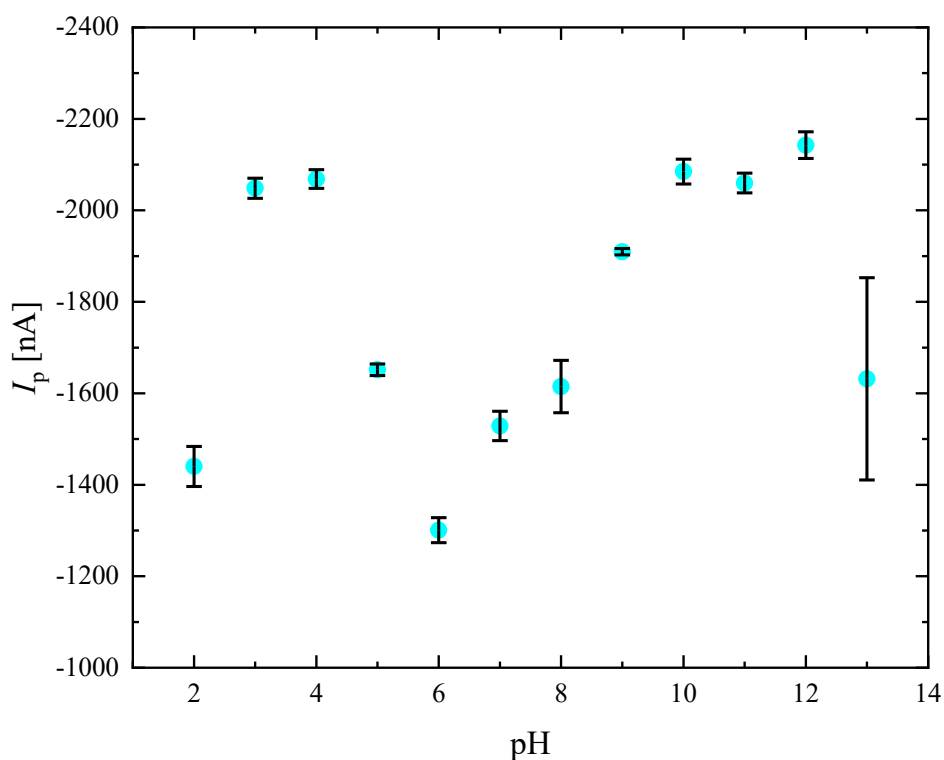
V další části experimentu byla věnována pozornost správnému odečtení výšky píku, a to pomocí dvou technik. První typ vyhodnocení byl proveden proložením základní linie přímo v programu Polar Pro a následným odečtením proudu píku metronidazolu (I_p) od této linie při určitém potenciálu (E_p) pracovní stříbrné pevné elektrody (AgSE). Druhý typ vyhodnocení byl proveden přímým odečtením proudu samotného Na-BRP (I_b), kterému rovněž odpovídal určitý potenciál elektrody (tedy $E_p = E_b$), od výšky píku metronidazolu (I_p). Pro zajímavost byly grafy předvedeny jak s regenerací, tak i bez regenerace této elektrody.



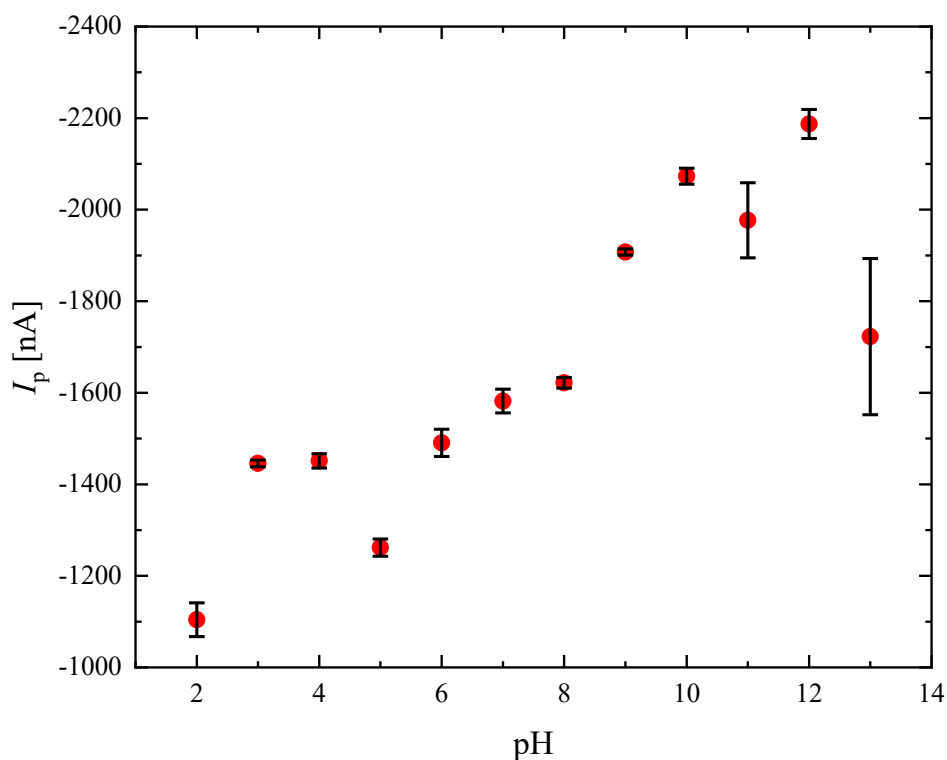
Obrázek 8 - DP voltamogramy pro první (A a B) a druhý (C a D) způsob vyhodnocení píku metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) zaznamenané na AgSE v Na-BRP o pH 10,0. I_p - proud píku metronidazolu, E_p - potenciál píku této látky, I_b - proud pozadí při změřeném potenciálu E_b , shodným s E_p . Základní parametry měření pro (A a C): $E_{in} = 0$ mV, $E_{fin} = -1300$ mV, $v_p = 20$ mV/s; a pro (B a D) $E_{in} = 0$ mV, $E_{fin} = -800$ mV, $v_p = 20$ mV/s. Parametry elektrochemické regenerace pro (B a D): $N_r = 150$, $E_{in_r} = 0$ mV, $T_{in_r} = 0,1$ s, $E_{fin_r} = -1500$ mV, $T_{fin_r} = 0,1$ s, stupeň vyhlazení křivek 7 metodou Adjacent-Averaging s váženým průměrem.

4.3 Vyhodnocení škály pH pro metronidazol v Na-BRP

Po proměření celé škály pH bylo nutno ověřit, zda toto vybrané prostředí (Na-BRP o pH 10,0) opravdu splňuje podmínky pro další měření. Proto byly sestaveny následující grafy, ze kterých vyplývá, jaký druh odečtení výšky píku metronidazolu je nejvhodnější a jaké pH bude nakonec definitivně zvoleno. V **obrázku 9** (odečítání proudu píku od základní linie) jsou pro odlišení proudy píku označeny tyrkysovou barvou a v **obrázku 10** (odečítání proudu píku od pozadí základního elektrolytu) červenou.



Obrázek 9 - Závislost proudu DPV píku (I_p) metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) na pH registrovaná na AgSE v Na-BRP v rozmezí pH 2,0-13,0 při odečítání proudu píku od základní linie. (Černými úsečkami jsou zobrazeny směrodatné odchylky pro $n = 5$.)



Obrázek 10 - Závislost proudu DPV píku (I_p) metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) na pH registrovaná na AgSE v Na-BRP v rozmezí 2,0-13,0 při odečítání proudu píku od pozadí základního elektrolytu (od Na-BRP). (Černými úsečkami jsou zobrazeny směrodatné odchylky pro $n = 5$.)

Z **obrázků 9 a 10** je očividné, že nejvhodnější podmínky pro další měření nejlépe splňuje opravdu pH 10,0, při kterém mají odezvy metronidazolu dostatečnou výšku a nízký rozptyl. Jako vhodnější metoda pro odečítání výšky píku metronidazolu je přímé odečtení proudu základního elektrolytu od odezvy studovaného analytu, které bylo rovněž použito v dalších částech této práce. Uvažováno bylo také o použití prostředí s pH 9,0, 11,0 nebo 12,0, ale z důvodu nižší proudové odezvy u pH 9,0 (v případě pH 11,0 i o dost větší směrodatné odchylky a případě pH 12,0 horší vyhodnotitelnosti píků) od toho bylo nakonec upuštěno.

Tabulka 2 - Vliv pH na potenciálu píku (E_p) a proud píku (I_p) metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) při DPV na AgSE v prostředí Na-BRP. I_p odpovídá vrcholu píku křivky při určitém pH a E_p , potenciálu tohoto vrcholu. (Byly provedeny dva typy odečtení nejvyššího bodu naměřené křivky, viz kapitola 4.2)

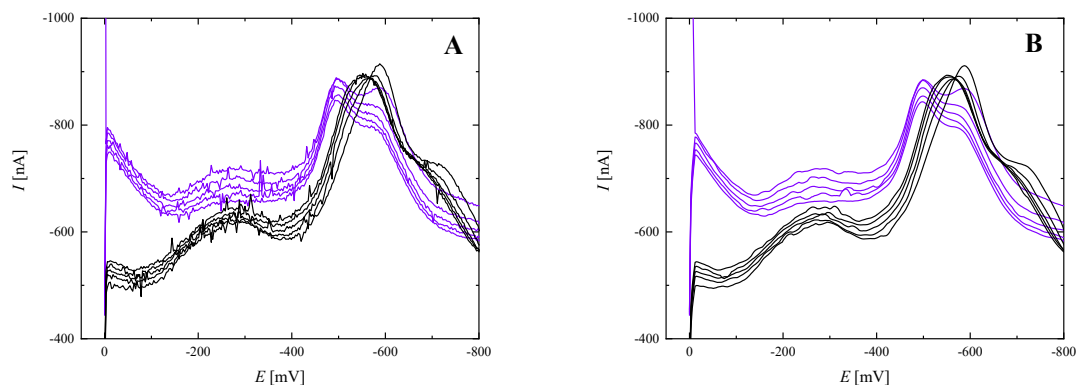
pH	E_p [mV]	I_p [nA] (odečtení od základní linie)	I_p [nA] (přímé odečtení pozadí)
2,0	-138	-1440	-1104
3,0	-201	-2048	-1446
4,0	-219	-2068	-1451
5,0	-266	-1651	-1262
6,0	-321	-1301	-1491
7,0	-366	-1529	-1582
8,0	-402	-1615	-1622
9,0	-429	-1910	-1907
10,0	-470	-2085	-2073
11,0	-509	-2060	-1977
12,0	-517	-2143	-2187
13,0	-447	-1632	-1723

4.4 Vliv elektrochemické aktivace, regenerace a leštění na AgSE

Použití elektrochemické aktivace (kapitola 4.1) před samotným měřením na AgSE mělo významnou roli na zlepšení odezvy (snížení proudu) použitého tlumícího roztoku.

Dále bylo na této elektrodě testováno použití regeneračních potenciálů mezi jednotlivými stanoveními pro zlepšení opakovatelnosti stanovení. Bylo zjištěno že, DP voltamogramy mají při absenci regenerace vyšší, avšak méně opakovatelné hodnoty naměřeného proudu píku než ty, při kterých byla regenerace aplikována. Po vyzkoušení několika dvojic počátečních (E_{in_r}) a koncových (E_{fin_r}) regeneračních potenciálů (potenciály vkládány na AgSE za stálého míchání roztoku střídavě v intervalech 0,1 s (T_{in_r} a T_{fin_r}) celkem $150 \times (N_r)$) byly jako finální parametry zvoleny: $N_r = 150$, $E_{in_r} = 0$ mV, $T_{in_r} = 0,1$ s, $E_{fin_r} = -1500$ mV, $T_{fin_r} = 0,1$ s. Použitá elektrochemická regenerace nepůsobila pouze na odezvu samotného Na-BRP, ale měla vliv i na výšku a šířku píku metronidazolu, viz **obrázek 11**. Je vidět, že při zapnuté regeneraci jsou píky užší, vyšší a lze je snadněji vyhodnotit.

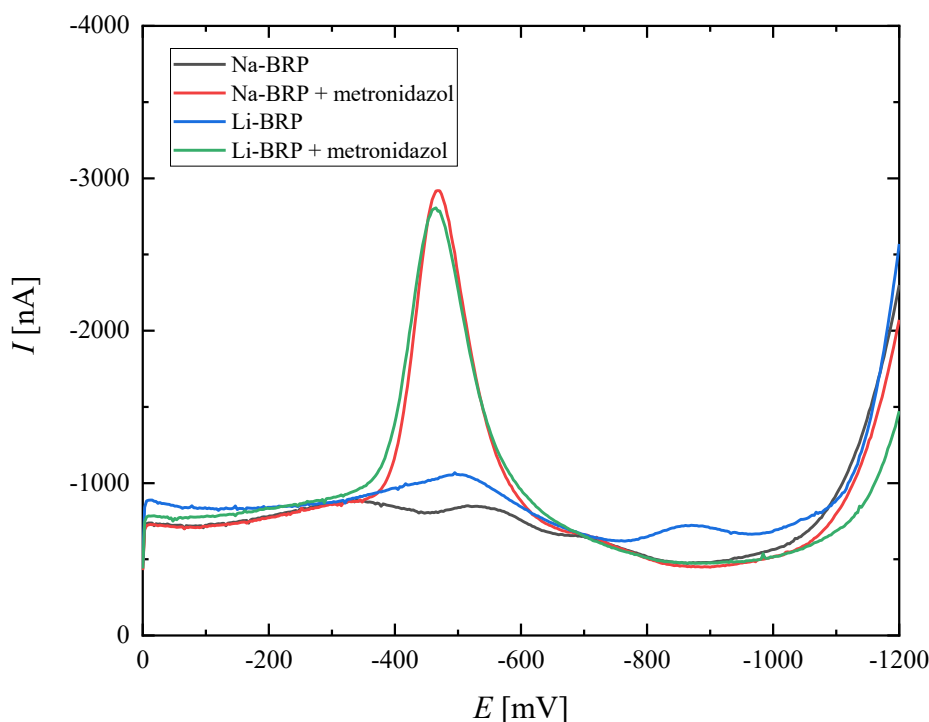
Kromě regenerace a aktivace AgSE bylo také přistoupeno k leštění této elektrody aluminou. Tato technika se ale nejevila jako příliš účinná, protože po každém vyleštění povrchu došlo ke změně homogenity používané pracovní elektrody a následně ke zvýšení proudu pozadí při dalším měření (základního elektrolytu).



Obrázek 11 - DP voltamogramy metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l zaznamenané na AgSE v Na-BRP o pH 10,0; původní záznamy (A) a křivky vyhlazené stupněm 7 metodou Adjacent-Averaging s váženým průměrem. (B) Fialové křivky byly zaznamenány **bez použité elektrochemické aktivace AgSE** a se zapnutou elektrochemickou regenerací elektrody, kdežto černé křivky byly zaznamenány **po elektrochemické aktivaci AgSE** a se zapnutou elektrochemickou regenerací elektrody, (základní parametry měření: $E_{in} = 0$ mV, $E_{fin} = -800$, $v_p = 20$ mV/s; použité parametry regenerace: $N_r = 150$, $E_{in_r} = 0$ mV, $T_{in_r} = 0,1$ s, $E_{fin_r} = -800$ mV, $T_{fin_r} = 0,1$ s).

4.5 Testování dalších pufrů

Kromě již testovaného Na-BRP byl dále metronidazol proměřen ještě v Li-BRP, ve kterém byla složka hydroxidu sodného nahrazena hydroxidem lithným o stejné koncentraci. Tato alternativa se zkoumala kvůli přítomným interferujícím stopovým nečistotám, jež poskytovaly voltametrický signál při obdobných potenciálech jako metronidazol. Pro dosažení nižší meze stanovitelnosti a detekce by bylo možné použití vysoce čistých vstupních chemikálií, a to především hydroxidu sodného (případně pak hydroxidu lithného). Pro srovnání obou těchto pufrů byl vytvořen **obrázek 12**, ve kterém je vidět, proč byl pro další analýzy zvolen právě Na-BRP. Dále byl použit ještě uhličitanový pufr o přibližné koncentraci 0,01; 0,05 a 0,1 mol/l. Tento tlumivý roztok však neměl dobrou trvanlivost. Časem u něj docházelo ke snížení odezvy proudu píku metronidazolu, zároveň nabývala odezva samotného pufru, a proto od jeho dalšího využití bylo následně upuštěno.



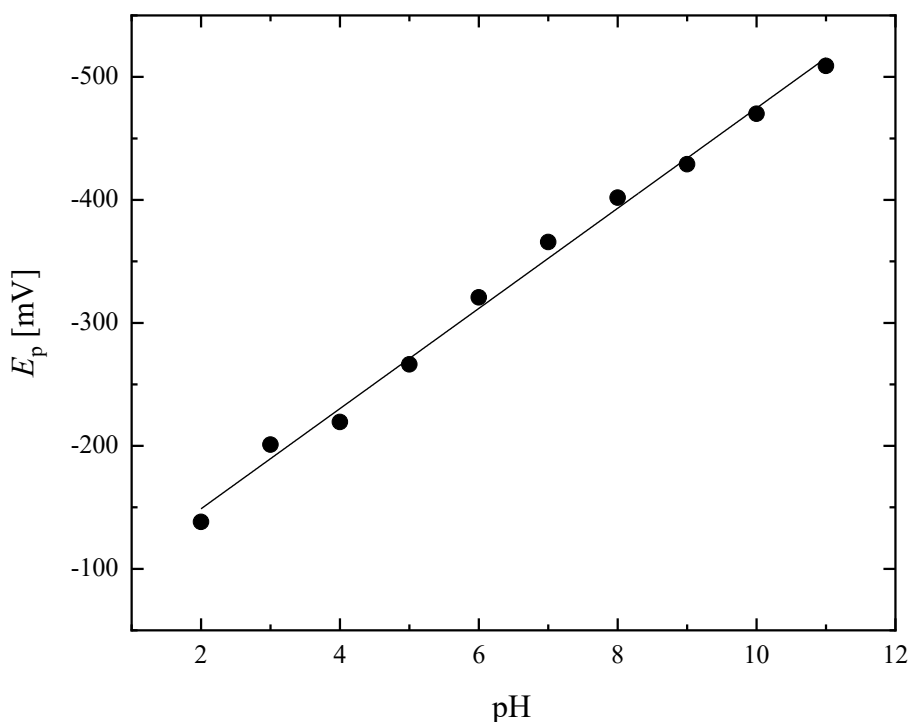
Obrázek 12 - DP voltamogram metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) a základních elektrolytů zaznamenané na AgSE v Na-BRP a Li-BRP (křivky bez vyhlazení, bez elektrochemické regenerace AgSE, základní parametry měření: $E_{\text{in}} = 0$ mV, $E_{\text{fin}} = -1300$ mV a $v_p = 20$ mV/s).

4.6 Vliv pH na potenciál píku metronidazolu

Obrázek 13 a **tabulka 3** dokazují, jak moc se vlastnosti použité AgSE přibližují či vzdalují chování elektrody s ideální (Nernstovskou) odezvou. Takové chování je popsáno předpisem, konkrétně Nernstovou rovnicí, a lineární závislost potenciálu píku na pH vykazuje směrnici -59 mV/pH , která odpovídá výměně stejného počtu (elektronů a protonů) při elektrodové reakci (v případě metronidazolu se jedná o výměnu $4e^-$ a $4H^+$). Na AgSE byla získána směrnice $-40,7 \text{ mV/pH}$, z čehož vyplývá, že elektrochemická aktivita této elektrody není zcela ideální.

Tabulka 3 - Parametry lineární závislosti potenciálu píku metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$) na pH registrované na AgSE v Na-BRP.

Rozsah pH	Směrnice [mV/pH]	Úsek [mV]	R^2
2,0-11,0	$-40,7 \pm 1,1$	$-67,4 \pm 7,9$	0,9941



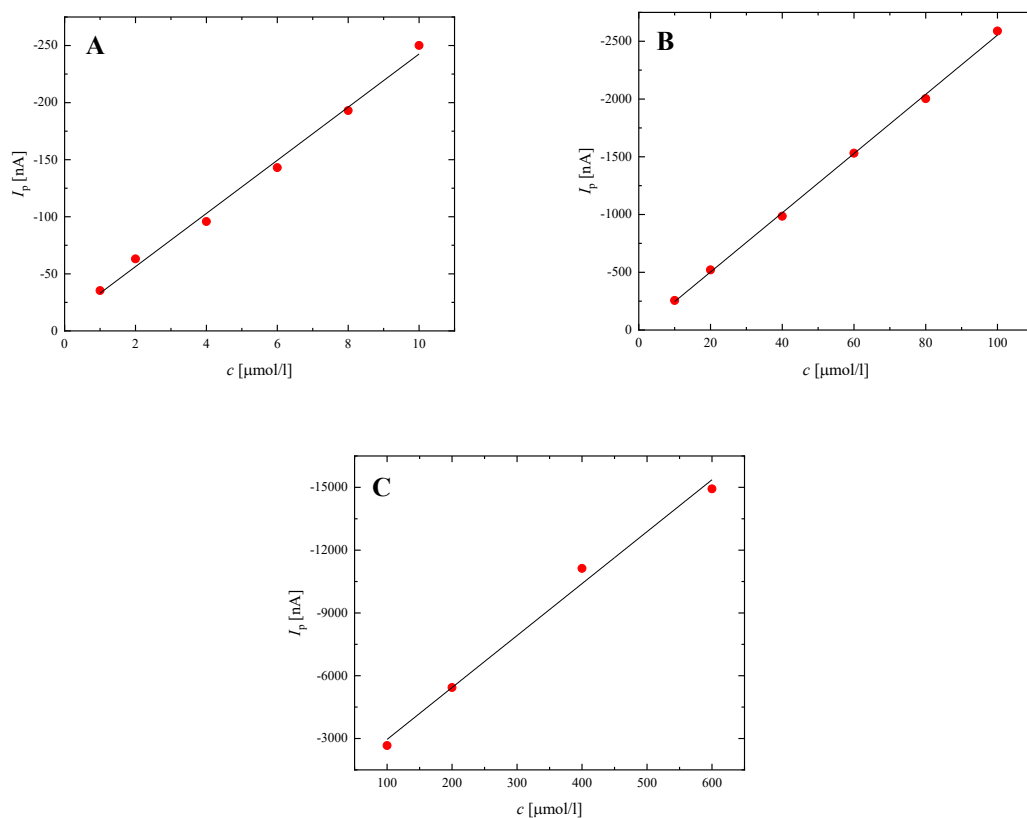
Obrázek 13 - Závislost potenciálu píku (E_p) metronidazolu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$) na pH registrovaná na AgSE v Na-BRP.

4.7 Kalibrační závislosti

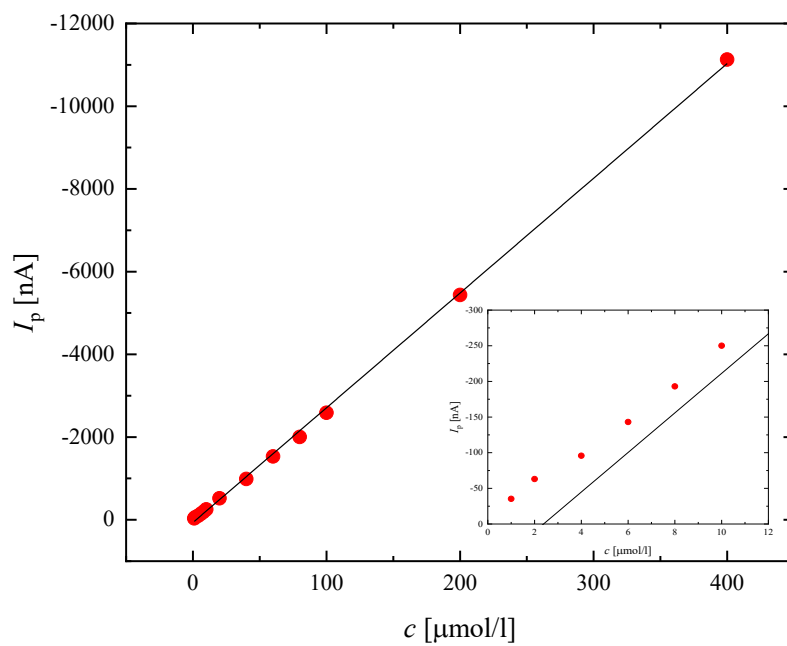
Po nalezení optimálního prostředí a dvojice vhodných regeneračního potenciálu ($E_{in_r} = 0$ mV a $E_{fin_r} = -1500$ mV) byla v Na-BRP o pH 10,0 proměřena kalibrační závislost pro koncentrační rozmezí $(1-10) \cdot 10^{-6}$, $(1-10) \cdot 10^{-5}$ a $(1-10) \cdot 10^{-4}$ mol/l (**obrázky 14 a 15**). Všechny měřené koncentrace byly připraveny pipetováním jednotlivých přídavků metronidazolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l pro řady $(1-10) \cdot 10^{-6}$ a $(1-10) \cdot 10^{-5}$ mol/l a dále o hodnotě $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l pro řád $(1-10) \cdot 10^{-4}$ mol/l. Parametry získaných kalibračních přímek jsou uvedeny v **tabulce 4**. Vzhledem k zakřivujícímu se průběhu kalibrační křivky u posledních dvou nejvyšších měřených koncentrací nebyly u nejvyššího koncentračního řádu do kalibrační přímky zahrnuty koncentrace $8 \cdot 10^{-4}$ a $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Ze stejného důvodu pak byly vyřazeny hodnoty $6 \cdot 10^{-4}$, $8 \cdot 10^{-4}$ a $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l v kalibrační závislosti, která prochází přes všechny řady měřených koncentrací (**obrázek 14**). Z **obrázku 16-A** lze celkem dobře vidět vliv přítomných nečistot. Tento nežádoucí efekt by mohl být v budoucnu odstraněn použitím vysoce čistých vstupních chemikálií.

Tabulka 4 - Parametry kalibračních přímek (k - směrnice, q - úsek) stanovení metronidazolu DP voltametrií na AgSE v prostředí Na-BRP o pH 10,0 s regeneračními potenciály $E_{in_r} = 0$ mV a $E_{fin_r} = -1500$ mV.

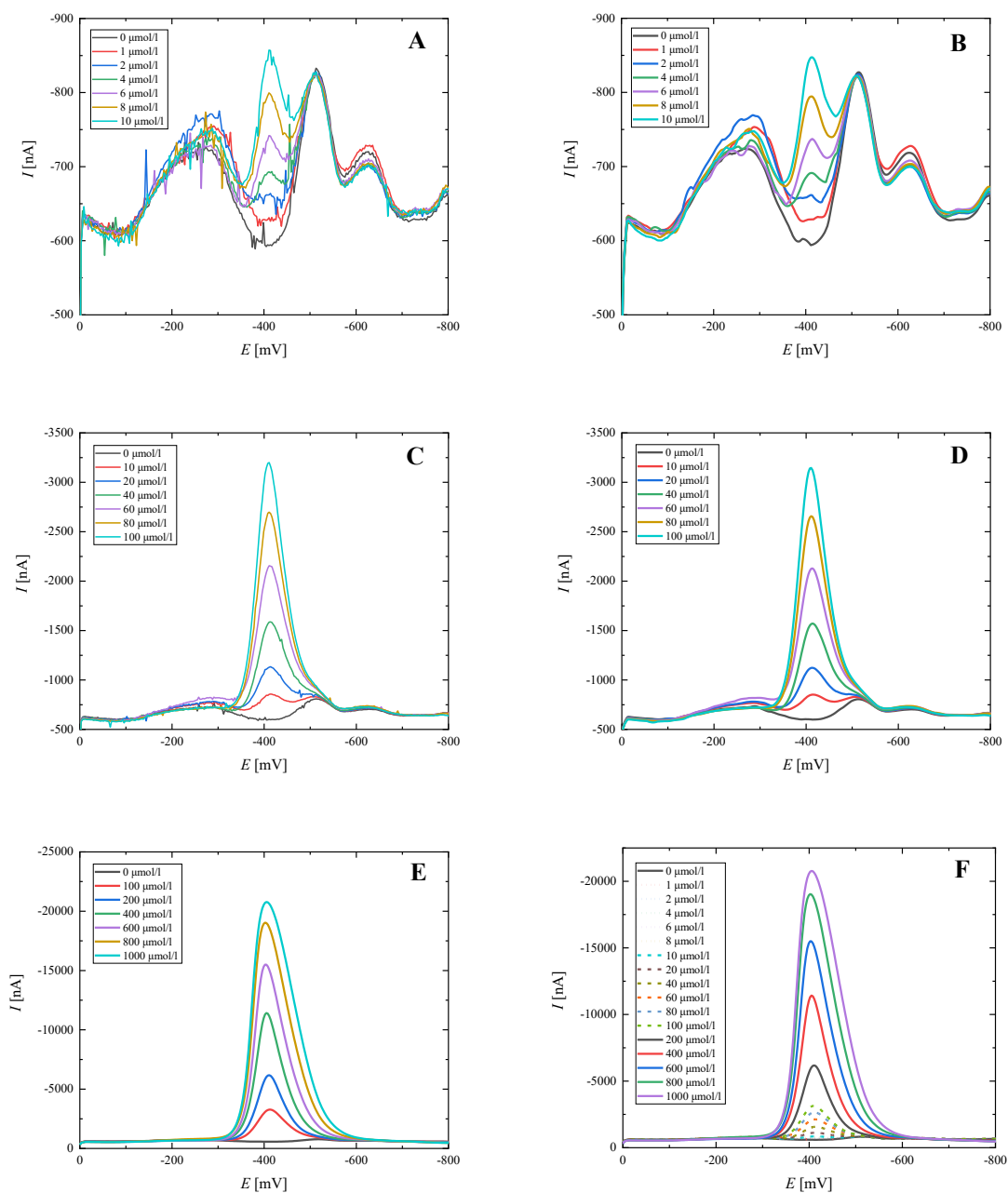
c [mol/l]	k [nA·l/μmol]	q [nA]	R^2	LOQ [mol/l]	LOD [mol/l]
$(1-6) \cdot 10^{-4}$	$-24,82 \pm 1,65$	-470 ± 620	0,9912	-	-
$(1-10) \cdot 10^{-5}$	$-25,64 \pm 0,40$	10 ± 25	0,9990	-	-
$(1-10) \cdot 10^{-6}$	$-23,28 \pm 0,92$	$-9,8 \pm 5,6$	0,9938	$1,8 \cdot 10^{-6}$	$5,5 \cdot 10^{-7}$
$(1-400) \cdot 10^{-6}$	$-27,75 \pm 0,21$	66 ± 28	0,9994	-	-



Obrázek 14 - Kalibrační závislosti metronidazolu v rozsahu koncentrací (A) $(1-10) \cdot 10^{-6}$ mol/l, (B) $(1-10) \cdot 10^{-5}$ mol/l a (C) $(1-6) \cdot 10^{-4}$ mol/l.



Obrázek 15 - Kalibrační křivka metronidazolu pro koncentrační rozmezí $(1-400) \cdot 10^{-6}$ mol/l. Ve vloženém grafu je zobrazen zvětšený výsek koncentračního rozmezí $(1-10) \cdot 10^{-6}$ mol/l.



Obrázek 16 - DP voltamogramy metronidazolu registrované na AgSE v Na-BRP o pH 10,0 v rozsahu koncentrací **(A)** a **(B)** $(1-10) \cdot 10^{-6}$ mol/l, **(C)** a **(D)** $(1-10) \cdot 10^{-5}$ mol/l, **(E)** $(1-10) \cdot 10^{-4}$ mol/l a **(F)** $(1-1000) \cdot 10^{-6}$ mol/l. Grafy označené jako **A** a **C** jsou surová data bez jakéhokoli vyhlazení, zatímco grafy **B**, **D**, **E** a **F** jsou upravené pomocí metody Adjacent-Averaging s váženým průměrem, se stupněm vyhlazení 7. (Základní parametry měření: $E_{in} = 0$ mV, $E_{fin} = -800$ mV, $v_p = 20$ mV/s; použité parametry regenerace: $N_r = 150$, $E_{in_r} = 0$ mV, $T_{in_r} = 0,1$ s, $E_{fin_r} = -1500$ mV, $T_{fin_r} = 0,1$ s.)

5 Závěr

V této bakalářské práci bylo zkoumáno využití pracovní stříbrné pevné elektrody (AgSE) pro stanovení léčiva metronidazol pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV).

Optimální podmínky stanovení byly nalezeny ve vodném prostředí Brittonova-Robinsonova pufru (Na-BRP) o pH 10,0. Základní parametry měření byly $E_{in} = 0$ mV, $E_{fin} = -800$ mV, $v_p = 20$ mV/s a použité parametry regenerace pak $N_r = 150$, $E_{in_r} = 0$ mV, $T_{in_r} = 0,1$ s, $E_{fin_r} = -1500$ mV, $T_{fin_r} = 0,1$ s. Kalibrační závislost je lineární v rozsahu koncentrací $(1-400) \cdot 10^{-6}$ mol/l, lze však využít i samotné kalibrační přímky pro jednotlivé koncentrační řady. Dosažené meze stanovitelnosti (*LOQ*) a detekce (*LOD*) činily $1,8 \cdot 10^{-6}$ mol/l a $5,5 \cdot 10^{-7}$ mol/l. V porovnání s jinými typy elektrod v prostředí Na-BRP (**tabulka 5**) vychází studovaná AgSE relativně dobře. Například při porovnání meze stanovitelnosti metronidazolu získané na elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) je *LOQ* pracovní stříbrné pevné elektrody (AgSE) dokonce nižší a na GCE modifikované DNA vychází jen nepatrně lépe než na AgSE. Pokud však budeme chtít stanovit metronidazol při nižší koncentraci, tak se jako nejlepší varianta jeví visící rtuťová kapková elektroda (HMDE).

Praktická aplikace nově vyvinuté voltametrické metody pro stanovení metronidazolu bude v budoucnu ověřena na environmentálních vzorcích pitné a říční vody, ve vybraných lékových formách a biologických tekutinách (lidská moč). Tento výzkum bude proveden v rámci autorovy navazující diplomové práce.

Tabulka 5 - Stanovení metronidazolu DPV na AgSE a porovnání mezí stanovitelnosti i na jiných elektrodách.

Elektroda	Prostředí	<i>LOQ</i> [mol/l]	Literatura
AgSE	Na-BRP o pH 10,0	$1,8 \cdot 10^{-6}$	tato práce
m-AgSAE	Na-BRP o pH 8,0	$1,9 \cdot 10^{-7}$	[24]
p-AgSA-CE	Na-BRP o pH 4,0	$4,3 \cdot 10^{-6}$	[34]
HMDE	Na-BRP o pH 9,0	$3,6 \cdot 10^{-8}$	[35]
GCE	Na-BRP o pH 4,5	$3,4 \cdot 10^{-6}$	[36]
GCE modifikovaná DNA	Na-BRP o pH 4,5	$1,7 \cdot 10^{-6}$	[36]

6 Použitá literatura

1. ChemSpider – Chemical Database (Royal Society of Chemistry): *5-Nitroimidazole, Metronidazole* <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.24776048.html>> (stav ke dni 8.6.2020)
2. Raether W., Hänel H.: Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research* **90**, S19–S39 (2003). doi: 10.1007/s00436-002-0754-9
3. Jiang X., Lin X.: Voltammetry of the interaction of metronidazole with DNA and its analytical applications. *Bioelectrochemistry* **68** (2), 206–212 (2006). doi: 10.1016/j.bioelechem.2005.08.003
4. Edwards D. I.: Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanism of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31** (1), 9–20 (1993). doi: 10.1093/jac/31.1.9
5. Trinh S., Reysset G.: Mutagenic action of 5-nitroimidazoles: In vivo induction of GC→CG transversion in two *Bacteroides fragilis* reporter genes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **398** (1–2), 55–65, (1998). doi: 10.1016/s0027-5107(97)00240-6
6. Semantic Scholar: *Imidazole-Based Antiparasitic Drugs* <<https://www.semanticscholar.org/paper/Development-of-drugs-based-on-imidazole-and-recent-Gaba-Mohan/7a7221ceccbc1590fbc0c237f54123f8e117f2b5/figure/11>> (stav ke dni 10.6.2020).
7. Chemspider – Chemical Database (Royal Society of Chemistry): *Metronidazole* <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4029.html?rid=1cb30654-cbc7-4104-9527-8e04c57fa6a>> (stav ke dni 8.6.2020).
8. Státní ústav pro kontrolu léčiv: *Český lékopis 2017*. SÚKL, Praha (2017).
9. Yalkowsky S. H., He Y.: *Handbook of Aqueous Solubility Data: An Extensive Compilation of Aqueous Solubility Data for Organic Compounds Extracted from the AQUASOL dATABASE*. CRC Press, Boca Raton (2003), str. 282.
10. Freeman C. D., Klutman N. E., Lamp K. C.: Metronidazole. *Drugs* **54** (5), 679–708 (1997). doi: 10.2165/00003495-199754050-00003
11. Drugs.com: *Metronidazole* <<https://www.drugs.com/ingredient/metronidazole.html>> (stav ke dni 8.6.2020).
12. Golan D. E., Tashjian Jr. A. H., Armstrong E. J., Armstrong A. W.: *Principles of Pharmacology. The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*, 2. vyd. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore (2008).

-
13. Semantic Scholar: Mechanism of Action of Nitroimidazoles
<<https://www.semanticscholar.org/paper/Development-of-drugs-based-on-imidazole-and-recent-Gaba-Mohan/7a7221ceccbc1590fbc0c237f54123f8e117f2b5/figure/10>>
(stav ke dni 10.6.2020).
 14. Lamp K. C., Freeman C. D., Klutman N. E., Lacy M. K.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials. *Clinical Pharmacokinetics* **36** (5), 353–373 (1999). doi: 10.2165/00003088-199936050-00004
 15. Mattila J., Mannisto P. T., Mantyla R., Nykanen S., Lamminsivu U.: Comparative pharmacokinetics of metronidazole and tinidazole as influenced by administration route. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **23** (5), 721–725 (1983). doi: 10.1128/aac.23.5.721
 16. Cunningham F. E., Kraus D. M., Brubaker L., Fischer J. H.: Pharmacokinetics of intravaginal metronidazole gel. *The Journal of Clinical Pharmacology* **34**, 1060–1065 (1994). doi: 10.1002/j.1552-4604.1994.tb01981.x
 17. Wain A. M.: Metronidazole vaginal gel 0.75% (MetroGel-Vaginal®): A brief review. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* **6** (1), 3–7. (1998). doi:10.1002/(sici)1098-0997(1998)6:1<3::aid-idog2>3.0.co;2-0
 18. Andersson K. E.: Pharmacokinetics of nitroimidazoles. Spectrum of adverse reactions. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplementum* **26**, 60–67 (1981).
 19. Dobiáš L., Černá M., Rössner P., Šrám R.: Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **317** (3), 177–194 (1994). doi: 10.1016/0165-1110(94)90001-9
 20. Jensen J. C., Gugler R.: Single- and multiple-dose metronidazole kinetics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **34** (4), 481–487 (1983). doi: 10.1038/clpt.1983.201
 21. Gupka K. V., Jain R., Radhapyari K., Jadon N., Agarwal S.: Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals. *Analytical Biochemistry* **408** (2), 179–196 (2011). doi: 10.1016/j.ab.2010.09.027
 22. Axmannová H.: *Stanovení metronidazolu na modifikované uhlíkové pastové elektrodě*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha (2013).
 23. Škvorová L.: *Voltametrické stanovení metronidazolu na leštěné stříbrné pevné amalgamové kompozitní elektrodě*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha (2010).
 24. Škvorová L.: *Voltametrické stanovení vybraných nitroimidazolových léčiv*. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha (2012).
 25. Šmídková M.: *Voltametrické stanovení 5-nitroimidazolu – strukturní jednotky nitroimidazolových léčiv*. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha (2013).

-
26. Vondrášková L.: *Hodnocení mikonazolu a metronidazolu v přípravku pomocí HPLC*. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové (2016).
27. Lei H., Guo J., Lv Z., Zhu X., Xue X., Wu L., Cao W.: Simultaneous determination of nitroimidazoles and quinolones in honey by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. *International Journal of Analytical Chemistry* 2018, 4271385, (2018). doi: 10.1155/2018/4271385
28. Ezzeldin E., El-Nahhas T. M.: *New analytical method for the determination of metronidazole in human plasma: Application to bioequivalence study*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 11(5), 799–805 (2012). doi: 10.4314/tjpr.v11i5.14
29. Farahat S. I., Salam R. A. A., Hadad G. M., El-Gindy A., Hassan T. H.: An ecofriendly green liquid chromatographic method for simultaneous determination of amoxicillin, metronidazole and ciprofloxacin; Application to dosage form and human urine. *Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 3 (1), 49–60 (2019). doi: 10.21608/RPBS.2019.66749
30. Jafari M. T., Rezaei B., Zaker B.: Ion mobility spectrometry as a detector for molecular imprinted polymer separation and metronidazole determination in pharmaceutical and human serum samples. *Analytical Chemistry* 81 (9), 3585–3591 (2009). doi: 10.1021/ac802557t
31. Saffaj T., Charrouf M., Abourriche A., Abboud Y., Bennamara A., Berrada M.: Spectrophotometric determination of metronidazole and secnidazole in pharmaceutical preparations. *Il Farmaco* 59 (10), 843–846 (2004). doi: 10.1016/j.farmac.2004.06.001
32. Rege P., Meyer K., Kapadia N.: Simultaneous determination of norfloxacin and metronidazole from combined tablet dosage formulation by spectrophotometry. *The Pharma Innovation Journal* 8 (6), 975–979 (2019).
33. Siddappa K., Mallikarjun M., Reddy P. T., Tambe M.: Spectrophotometric determination of metronidazole through Schiff's base system using vanillin and PDAB reagents in pharmaceutical preparations. *Eclética Química* 33 (4), 41–46 (2008). doi: 10.1590/S0100-46702008000400005
34. Vyskočil V., Navrátil T., Daňhel A., Dědík J., Krejčová Z., Škvorová L., Tvrdíková J., Barek J.: Voltammetric determination of selected nitro compounds at a polished silver solid amalgam composite electrode. *Electroanalysis* 23 (1), 129–139 (2011). doi: 10.1002/elan.201000428
35. Gui Y., Ni Y. N., Kokot S.: Simultaneous determination of three 5-nitroimidazoles in foodstuffs by differential pulse voltammetry and chemometrics. *Chinese Chemical Letters* 22 (5), 591–594 (2011). doi: 10.1016/j.cclet.2010.12.014
36. Brett A. M. O., Serrano S. H. P., Gutz I., La-Scalea M. A.: Electrochemical reduction of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 42 (2), 175–178 (1997). doi: 10.1016/S0302-4598(96)05122-7